

## 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名：小池博之

所属：横浜市立大学大学院医学研究科 医科学専攻

審 査 員

主 査 横浜市立大学大学院医学研究科 教授 大保和之

副 査 横浜市立大学大学院医学研究科 教授 大野茂男

副 査 横浜市立大学大学院医学研究科 教授 小川毅彦

## 博士の学位論文審査結果の要旨

### **Ring1B Promotes Hepatic Stem/Progenitor Cell Expansion via Simultaneous Suppression of Cdkn1a and Cdkn2a in Mice**

(Ring1B は *Cdkn1a* および *Cdkn2a* の発現抑制を介して肝幹・前駆細胞の増幅を亢進する)

本研究は、ポリコーム群(PcG)タンパク質 RingB に着目し、肝幹・前駆細胞の自己複製における役割および、肝幹・前駆細胞の自己複製制御に関わる下流遺伝子の同定を試みたものである。近年、ヒストン修飾に関わるとされる PcG タンパク質複合体が、胚性幹細胞の形質制御に関わる複数の遺伝子の発現制御を担っていることが明らかとされている。しかしながら、組織幹細胞における PcG タンパク質の下流標的遺伝子の理解は乏しく、如何に組織幹細胞の自己複製が制御され、成立しているか、という点は未解明であった。

本研究では、肝幹・前駆細胞が活発に自身のプールを増大させている器官発生の初期段階に着目し、Ring1B を任意の時期に欠損誘導可能な遺伝子改変マウスを用いた解析の結果が示された。発生初期の胎仔肝組織およびフローサイトメトリーを用いて分取した肝幹・前駆細胞を対象とした解析の結果、Ring1B は肝幹・前駆細胞の増殖および分化に深く関与することが明らかとなった。次に、Ring1B 下流遺伝子を特定する為に、サイクリン性依存性キナーゼインヒビターを対象とした機能解析を行った。その結果、*Cdkn1a* および *Cdkn2a* の双方の発現の抑制が肝臓の器官形成過程の初期における肝幹・前駆細胞の増幅に必須であることが確認された。

さらに、これらの研究成果は肝幹・前駆細胞の自己複製の理解だけでなく組織

幹細胞の人為的な操作への応用が期待されるということが説明された。

審査にあたり上記論文要旨の説明が行われた後、以下の質疑応答がなされた。

はじめに小川副査より、以下の質問がなされた。

- (1) 今回の研究はノックアウトマウスの作成から行ったものか。
- (2) 今回の研究において発表者が最も苦勞した点、独創的な点は何か。

これに対し、以下のような返答があった。

- (1) 本研究で用いている Ring1B ノックアウトマウスは共同研究を行っている理化学研究所の古関博士のグループが作成し、供与をうけたものである。さらに、Jackson 研究所より購入した他の遺伝子改変マウスとの交配により得られた二重欠損マウスを用いて解析を行っている。
- (2) 最も苦勞した点は、二重欠損マウスの解析である。Ring1B の下流遺伝子として期待された2種類の候補遺伝子 Cdkn1a, Cdkn2a の二重欠損マウスを作出して Ring1B の欠損による表現型を回復できるか否か検証を行ったが、予想に反して回復は見られなかった。独創的な点は、Cdkn1a あるいは Cdkn2a の二重欠損マウスでは回復が見られなかったのに対して、Cdkn1a および Cdkn2a 双方の発現を抑制することを試みたことである。これまで PcG タンパク質下流解析において双方の発現抑制を試みた例はない。これにより初めて下流で機能する遺伝子を明らかにすることができた。

次に、大野副査から以下の質問がなされた。

- (1) 肝臓の発生を対象とした研究であるが、何故、最初にポリコーン群タンパク質やエピジェネティクスに着目したのか。
- (2) *in vivo* の解析では AFP, Ck8/18 を、*in vitro* の培養系ではインテグリンなどを

指標としており、肝幹・前駆細胞をキャラクタライズするマーカーが異なっているが、見ている対象が違う可能性はないか。 *in vivo* で見ている AFP, Ck8/18, BrdU 共陽性細胞は高い割合で存在しているが、 *in vitro* の系で見ているコロニー形成能と二分化能を有した細胞の頻度はどのくらいか。これらは 1 対 1 で対応した細胞ではないのではないか。

- (3) Ring1B を欠損すると増殖能も分化能も減少している。分化能が減少するという判断基準は、分化した細胞の頻度であるようだが、そもそも細胞増殖が減少したならば、そのあとに生じる分化した細胞も減少するため、分化マーカーの現象は、単に細胞数減少によるものではないか。分化に参与しているという結論が示せるのか。
- (4) *in vitro* のコロニーの解析で Cdkn1a, Cdkn2a のノックダウンを誘導した系で分化を評価しているが、この増殖が阻害されるような系で分化について議論できるのか。
- (5) この研究は、発生の初期を対象に解析を行っているが、成熟した肝臓ではこのような現象は起きていないのか。例えば、肝切除ではどうか。
- (6) *in vitro* のコロニー形成で、肝幹・前駆細胞を見ているが、その細胞は希釈をしていくと、何細胞あたり何個のコロニーが形成されるのか。
- (7) 肝臓の幹細胞、前駆細胞は本来区別できるのか。

これに対し、以下のような返答があった。

- (1) 組織幹細胞の自己複製は複数の遺伝子によって厳密に制御されているため、これらを明らかにする上で、複数の遺伝子発現の統合的な制御基盤であるポリコーン群タンパク質やエピジェネティクスに着目した。
- (2) フローサイトメトリーで分取した肝幹・前駆細胞画分を対象に AFP の発現を解析したところ、AFP の陽性率が非常に高いことが確認できたことから、 *in vitro* で見ている細胞は *in vivo* で見ている AFP 陽性細胞の一部と考えている。 *in vitro* で解析対象としている、高い増殖能と二分化能を有した細胞を肝幹・前駆細胞と捉えており、 *in vivo* で AFP を指標に解析している細胞集団は、

肝幹・前駆細胞とそれ以外の細胞を含む細胞集団であり, *in vivo* のマーカーの方がよりブロードなマーカーであると考えている.

- (3) 妊娠 8.5 日目から Ring1B を欠損した場合, 増殖と分化が抑制されることを確認している. さらに, 胎生 10.5 日目から Ring1B を欠損した場合についても解析しており, 増殖にはほとんど影響が見られないが, 肝細胞, 胆管上皮細胞双方の分化マーカーの発現が大きく減少しており, Ring1B 欠損による分化の阻害は必ずしも増殖が減少したことの影響ではないことを確認している.
- (4) Cdkn1a, Cdkn2a 双方を阻害した条件では, 増殖がレスキューされているため, コロニーの大きさはコントロールと同等であるが, それにも関わらずアルブミン陽性を示す細胞の頻度は, レスキューされないことを確認している.
- (5) 成体の肝臓においては Ring1B の発現は低い. 肝切除に関しても解析は行っているが, Ring1B の欠損による影響は見られない. 肝臓より分離した成熟肝細胞を対象に Ring1B の欠損を誘導しても同様に, 増殖性に与える影響は見られないことから, 成体の肝臓において Ring1B の増殖への寄与はほとんど無いと考えられる.
- (6) 肝幹・前駆細胞が高頻度に出現する解析系ではないので, 頻度としては数%程度である.
- (7) 実際は切り分けることができなく, 今回の研究では幹・前駆細胞として解析している.

最後に, 大保主査から以下の指摘および質問がなされた.

- (1) 胎生期の肝臓の増殖因子としてわかっているものは何か.
- (2) Ring1B は, ターゲットとして Cdkn1a や Cdkn2a 以外の増殖因子の発現にも関わっていて, 直接的ではなく何段階か先かもしれないが, 他の増殖因子のリプレッサーを制御している可能性が考えられるが, 例えばマイクロアレイの

解析などからそのような視点で探索を行っているか。

- (3) Ring1B は胎仔期の早い段階、遅い段階双方で発現しているか。Ring1B は発生期間中増減はあっても発現はしているのか。Cdkn1a と Cdkn2a の発現はどうか。
- (4) Ring1B は常に Cdkn1a と Cdkn2a をターゲットとしているのか。発生初期で Ring1B 欠損をすると影響がみられ、後期では影響が見られないことの解釈は。Ring1B が常に Cdkn1a と Cdkn2a をターゲットとしているかについて確認を行っているか。モレキュラーメカニズムはどう想定しているか。
- (5) in vitro の分化評価系では、二重欠損に加えてノックダウンを行いコロニーの分化マーカーの発現を解析しているが、増殖は回復しているにも関わらず元のようなマーカーを発現しない細胞は何なのか。この解析系は未分化な細胞を増殖させているのか、分化誘導系なのか。未分化性の高い細胞が増えているのか。

これに対し、以下のような返答があった。

- (1) 成体の肝臓と同様に HGF が関与している。実際、肝幹・前駆細胞の培養系には必須である。
- (2) 他の増殖因子のリプレッサーを制御している可能性は十分にあると考えている。Ring1B は遺伝子発現を抑制するが、マイクロアレイ解析をしたときに Ring1B の欠損によって発現が減少する遺伝子も 200 程度確認されており、何段階か先の制御を行っていることも確認している。それらの遺伝子の解析についてはまだ解析が進んでいない。
- (3) Ring1B は胎生 11.5 日目以前ではそれ以降の段階に比べて高い発現を示すことを確認している。発生後期においても Ring1B は発現はしている。一方、Cdkn1a と Cdkn2a はいずれも発生初期、すなわち Ring1B の発現が高い時期において発現が低いことを確認している。確認は mRNA で行っている。
- (4) Ring1B は肝発生の初期では Cdkn1a, Cdkn2a をターゲットとしていると考えられているが、時期特異的な標的遺伝子への集積は確認していない。ES 細胞で

は分化の進行と共に, PcG タンパク質がターゲット遺伝子を変化させることが確認されており, 今回も同様にターゲットの変化が生じていると考えている.

- (5) この培養系は未分化細胞が増殖すると共に, 分化も同時に生じた解析系である. 増えてきた細胞は, 未分化性を維持した細胞ではなく, 分化能が破綻してしまった細胞で, 正常の分化プロセスが起こっていないと考えている.

このほかにも多くの質問がなされたが, いずれも適切な回答がなされた.

以上の審査から本研究は, 肝幹・前駆細胞の増殖制御担う遺伝子を特定したものであり, 学術的に高く評価できる内容である. また, 本研究に対する申請者の理解も十分に深いと考えられる. したがって審査の結果, 本研究は博士(医学)の学位に値するものと判断された.